

University of Groningen

Innovative coatings for anti-bacterial surfaces

Swartjes, Jan

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2015

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Swartjes, J. (2015). *Innovative coatings for anti-bacterial surfaces*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. [S.n.].

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

SAMENVATTING

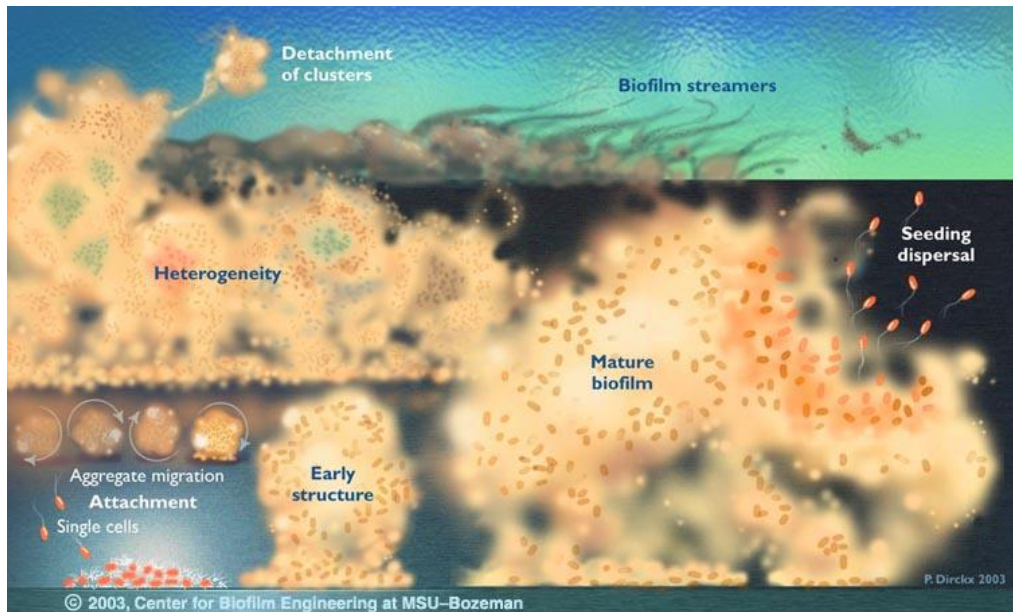
SAMENVATTING

De belangrijkste oorzaak voor het falen van een biomedisch implantaat, ondanks de vele preventie methoden en het gebruik van antibiotica, is de hechting van bacteriën. De procedures voor het creëren van een steriele omgeving in de operatiekamer zijn bijna maximaal geoptimaliseerd en door de afname van de ontdekking van nieuwe en betere antibiotica, samen met de toenemende antibiotica resistentie van vele bacteriën, neemt het aantal mogelijkheden om infecties te bestrijden af [1-4]. Het coaten van het oppervlak van een materiaal, met als doel het hechten van bacteriën te voorkomen, is daarom een veel onderzochte methode ter preventie van de hechting van bacteriën, de eerste stap in biofilm vorming. In **Hoofdstuk 1** wordt een overzicht gepresenteerd van recente ontwikkelingen op het gebied van antimicrobiële oppervlakte coatings. De meest toegepaste strategie tot dusver is het verminderen van hechting, waarvoor veelal polymere-borstel coatings gebruikt worden. Door de formatie van een sterk gehydrateerde laag van uitgestrekte polymere ketens, vormen polymere-borstel coatings een sterische barrière die hechting van bacteriën op het oppervlak voorkomt. Echter, zelfs de beste polymere-borstel coating is niet in staat om de hechting van bacteriën in zijn geheel te voorkomen, en daarnaast groeien de enkele bacteriën die wel hechten uit tot een biofilm zodra ze de kans krijgen [5]. Het toevoegen van een antibacteriële substantie is daarom vereist om betere resultaten te verkrijgen wat betreft bacteriële hechting en biofilm vorming. Daarnaast zijn er ook applicaties waarbij weefsel integratie een voordeel is, en de gebruikte coatings mogen in dat geval de hechting van weefselcellen en de integratie van het materiaal in het lichaam, wat overigens de beste bescherming tegen bacteriële contaminatie biedt, niet verstoren. In dit proefschrift worden een aantal antibacteriële oppervlakte coatings beschreven, terwijl ook geprobeerd wordt de huidige kennis van mechanismen die bacteriën gebruiken om aan oppervlakken te hechten te vergroten, omdat dit waardevolle informatie oplevert die kan helpen bij het ontwikkelen van nieuwe strategieën om bacteriële hechting en biofilm vorming te voorkomen.

Coatings bestaande uit micro-patronen

Oppervlakte coatings gebaseerd op polyethyleen glycol (PEG) zijn lange tijd dominant geweest op het gebied van oppervlakte modificaties die hechting tegen moeten gaan [7]. Omdat de hechting van zowel eiwitten als bacteriën drastisch verminderde, werd het gezien als een veelbelovende coating voor biomedische implantaten en apparaten om de hechting van bacteriën en biofilm vorming tegen te gaan. Echter, als afstotende coating hinderen PEG polymere-borstel coatings ook de hechting van weefselcellen en sluiten de mogelijkheid tot weefsel integratie op deze manier uit, ook in toepassingen waar die integratie wenselijk, of zelf vereist is [8]. In **Hoofdstuk 2** worden oppervlakken gebruikt met een micro-patroon van PEG-hydrogelen om oppervlakken te creëren waarop bacteriën, door het afstotende karakter, niet hechten, terwijl tegelijkertijd bepaalde delen van het met silaan gemodificeerd glas oppervlak onveranderd worden gelaten, waardoor het voor weefselcellen mogelijk is om te hechten. Op deze manier worden de niet-hechtende eigenschappen omzeild, voor wat betreft weefselcellen, terwijl het voor bacteriën nagenoeg onmogelijk blijft om aan het oppervlak te hechten. Hoewel vele onderzoeken speciale peptide-sequenties zoals RGD gebruiken om hechting van cellen mogelijk te maken op PEG gemodificeerde oppervlakken [9,10], laten wij zien dat de combinatie van PEG hydrogelen en de juiste

hoeveelheid ongemodificeerd glas oppervlak effectief kan zijn in het tegengaan van bacteriële hechting, terwijl weefselcellen nog steeds in staat zijn om te hechten en te delen. Een ruimte van 1 μm tussen de PEG hydrogelen bleek de meest optimale afstand te zijn om de hechting van bacteriën significant te verlagen en osteoblasten de kans te geven om te hechten en te spreiden op het oppervlak. Deze ruimte tussen de hydrogelen, die in dezelfde orde van grootte valt als een bacterie, voorkomt de hechting van bacteriën, terwijl osteoblasten hun specifieke hechtingsmoleculen gebruiken die zich tot wel 100 μm kunnen uitstrekken en op die manier de ongemodificeerde plekken tussen de hydrogelen kunnen bereiken.



FIGUUR 1 Schematische weergave van de verschillende stappen van biofilm vorming, bestaande uit: initiële hechting, de vroege groeifase, biofilm maturatie, en tenslotte dispersie van de biofilm [6]. Auteursrecht in handen van Montana State University Center for Biofilm Engineering.

Oppervlakte modificaties met DNase I

eDNA is een zeer belangrijke component van de extracellulaire polymere substantie van bacteriën gebleken en speelt een belangrijke rol in de hechting van bacteriën en de daaropvolgende vorming, en het onderhoud, van biofilms. Behalve DNase I zijn er meerdere enzymen bestudeerd voor mogelijk gebruik in oppervlakte coatings om bacteriële hechting tegen te gaan, waaronder lysozyme en dispersin B [11,12]. In **Hoofdstuk 3** wordt een “proof of principle” van een functionele DNase I coating getoond, die effectief is in

het voorkomen van bacteriële hechting en biofilm formatie, door het gebruik van dopamine als een intermediair voor de hechting van DNase I. Door DNase I te gebruiken op het grensvlak tussen materiaal en bacterie werd de hechting van bacteriën voorkomen en biofilm vorming gedurende 14 uur drastisch verminderd. Dopamine wordt beschouwd als een chemisch stabiele bindingsmethode, wat ondersteund wordt door onderzoeken die slechts een klein verlies van aangebracht materiaal laten zien na blootstelling aan een fysiologische zoutoplossing gedurende tijdsintervallen tussen 7 en 30 dagen [13,14]. Echter, wanneer een materiaal in het lichaam geïmplant wordt, wordt het blootgesteld aan extreme condities die destructief zijn voor elke ‘zachte’ coating. Het vasthouden en plaatsen van het implantaat door de chirurg is hier één van, maar het mechanisch testen van coatings wordt zelden genoemd in studies. De aanwezigheid van DNase I en het behoud van de enzymatische activiteit is een andere uitdaging in het coating proces. Vandaar dat in **Hoofdstuk 4** poly-(lactic-co-glycolic)-acid (PLGA) gebruikt is als een hard polymeer dat mechanische stress kan weerstaan, en DNase I verpakt in een suikerglas, inuline, om het enzym te beschermen tijdens het coating proces. PLGA is een degradeerbaar polymeer dat is goedgekeurd door de U.S. Food and Drug Administration. Het PLGA degradeerde langzaam en de toegevoegde DNase I werd afgegeven over een langere tijd, waarbij de hechting van bacteriën op gecoat titanium met 99% afnam en de biomassa van 20 uur oude biofilms significant lager was dan zonder DNase I coating. Belangrijker, de PLGA coating bleek bestand tegen een aantal condities die simuleerden wat een implantaat ondergaat in de operatie kamer.

Laterale krachten in de hechting van bacteriën

Initiële hechting van bacteriën is, als zijnde de eerste stap in het vormen van biofilms, het belangrijkste focus punt in de preventie van biomateriaal geassocieerde infecties. Echter, terwijl het aantal potentiële methoden dat wordt ontwikkeld om bacteriële hechting te voorkomen toeneemt, blijven de exacte mechanismen waarmee bacteriën hechten slecht begrepen [15,16]. Grote stappen zijn gemaakt door het gebruik van “bacterial probe” microscopie waarbij de hechtingskrachten tussen individuele bacteriën en oppervlakken bestudeerd zijn en zelfs de krachten tussen specifieke structuren op de celwand en oppervlakken gemeten kunnen worden [17-19]. Echter, in al deze onderzoeken worden de krachten tussen bacteriën en het oppervlak loodrecht ten opzichte van het oppervlak gemeten. In de natuurlijke situatie, en in veel onderzoeken naar bacteriële hechting, naderen bacteriën een oppervlak vanuit een vloeistof die ze meevoert [20-22], wat inhoudt dat de krachten die ontstaan tussen deze bacteriën en het oppervlak in werkelijkheid parallel aan het oppervlak lopen. Daarom zijn laterale krachten gemeten tussen *Staphylococcus epidermidis* ATCC 25984 en verschillende polymere-borstel coatings. Hierbij werd een bacterie langs het oppervlak bewogen en de kracht gemeten met behulp van laterale kracht microscopie (**Hoofdstuk 5**). Door twee type PEG-moleculen in verschillende concentraties te gebruiken hebben we coatings gemaakt die verschilden in zachtheid en kwamen tot de conclusie dat niet alleen de wrijvingskrachten tussen polymere-borstel coatings en bacteriën sterk gerelateerd zijn aan het aantal bacteriën dat hecht, maar ook de zachtheid van de polymere-borstel coatings speelt een belangrijke rol in hoe succesvol de coating is in het weerstaan van bacteriële hechting. In het geval van zachte coatings

treedt veel meer maturatie van de binding tussen bacterie en oppervlak op vergeleken met harde coatings, waarvan bacteriën veel makkelijker loslaten na initieel contact.

Naast laterale krachten tussen bacteriën en polymere borstel coatings wordt in **Hoofdstuk 6** de invloed van specifieke interacties tussen bacteriën en oppervlakken op de laterale krachten bestudeerd. Hiervoor is een *Streptococcus mutans* stam gebruikt met antigeen I/II op het oppervlak, samen met een isogene mutant welke deze hechtings structuren niet heeft. De structuur van antigeen I/II is in de laatste tien jaar tot in detail bepaald en het is bekend dat zowel het distale deel als het domein dat in de celwand vastzit, in staat is om interacties aan te gaan met speciale receptoren in speeksel films [23,24]. Het vergelijken van de hechtingskrachten loodrecht en lateraal tussen deze twee stammen en glas gecoat met een speeksel film, suggereert dat de specifieke interacties tussen antigeen I/II en de speciale receptoren richtingsafhankelijk zijn en meer weerstand bieden tegen laterale krachten dan tegen krachten loodrecht op het oppervlak. Dit zou betekenen dat *S. mutans* zich heeft aangepast aan de zeer dynamische omgeving van de mondholte, waarin kauwen, bewegingen van de tong en de aanwezigheid van allerlei vloeistoffen zorgen voor grote laterale krachten. Het algemene karakter van de specifieke binding tussen bacteriën en de receptoren in speeksel houdt in dat een vergelijkbaar mechanisme ook zou kunnen optreden in andere bacteriële stammen die in staat zijn te hechten met behulp van specifieke interacties.

CONCLUSIES

Antibiotica onafhankelijke strategieën om infecties gerelateerd aan medische apparaten en implantaten te voorkomen zijn een cruciale factor voor het succes van de toekomstige geneeskunde. Problematisch in het ontwerp van oppervlakte modificaties voor deze toepassingen is de grote variatie in bestaande apparaten en implantaten, ieder met eigen eisen wat betreft stabiliteit, weefsel integratie en gebruiksduur. Onze resultaten laten zien dat oppervlakte modificaties bestaande uit patronen die hechting kunnen voorkomen en delen die hechting toestaan, kunnen bijdragen aan de weefsel integratie van implantaten, terwijl ze nog steeds zeer goed bestand zijn tegen de hechting van bacteriën. Een andere aanpak om hechting van bacteriën te voorkomen is door het gebruik van natuurlijke componenten, zoals enzymen, die een specifieke activiteit hebben om de hechting en biofilm vorming van bacteriën te kunnen verstoren. Door het gebruik van biodegradeerbare polymeren is het mogelijk om een robuuste oppervlakte coating te maken die deze substanties langzaam loslaat en het implantaat bacterie vrij houdt totdat weefsel integratie heeft plaatsgevonden. Echter, zoals in **Hoofdstuk 7** beschreven wordt, zullen deze oppervlakte modificaties veelal niet universeel toepasbaar zijn, en daarom is het belangrijk om door te gaan met het bestuderen van de mechanismen die bacteriën gebruiken om oppervlakken te koloniseren, iets waar nog lang niet alles over bekend is. We hebben een start gemaakt met het ontrafelen van de oorzaak van laterale, of wrijvings-, -krachten tussen bacteriën en oppervlakken, waar voorheen alleen de hechtingskrachten loodrecht op het oppervlak direct gemeten werden. Een beter begrip van de rol die laterale krachten spelen kan helpen bij het toekomstig ontwerp van nieuwe oppervlakte modificaties om de hechting van bacteriën te voorkomen.

REFERENCES

- [1] Lee, I.; Agarwal, R. K.; Lee, B. Y.; Fishman, N. O.; Umscheid, C. A. Systematic review and cost analysis comparing use of chlorhexidine with use of iodine for preoperative skin antisepsis to prevent surgical site infection. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2010**, *31*, 1219–1229.
- [2] Palmer, A. C.; Kishony, R. Understanding, predicting and manipulating the genotypic evolution of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Genet.* **2013**, *14*, 243–248.
- [3] Chow, T. T.; Yang, X. Y. Ventilation performance in operating theatres against airborne infection: review of research activities and practical guidance. *J. Hosp. Infect.* **2004**, *56*, 85–92.
- [4] Kährström, C. T. Entering a post-antibiotic era? *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 146–146.
- [5] Nejadnik, M. R.; Van der Mei, H. C.; Norde, W.; Busscher, H. J. Bacterial adhesion and growth on a polymer brush-coating. *Biomaterials* **2008**, *29*, 4117–4121.
- [6] Costerton, B. Microbial ecology comes of age and joins the general ecology community. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 16983–16984.
- [7] Konradi, R.; Acikgoz, C.; Textor, M. Polyoxazolines for nonfouling surface coatings: a direct comparison to the gold standard PEG. *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33*, 1663–1676.
- [8] Zhang, M.; Desai, T.; Ferrari, M. Proteins and cells on PEG immobilized silicon surfaces. *Biomaterials* **1998**, *19*, 953–960.
- [9] Muszanska, A. K.; Rochford, E. T. J.; Gruszka, A.; Bastian, A. A.; Busscher, H. J.; Norde, W.; Van der Mei, H. C.; Herrmann, A. Antiadhesive polymer brush coating functionalized with antimicrobial and rgd peptides to reduce biofilm formation and enhance tissue integration. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 2019–2026.
- [10] Burdick, J. A.; Anseth, K. S. Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGD-modified PEG hydrogels for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2002**, *23*, 4315–4323.
- [11] Muszanska, A. K.; Busscher, H. J.; Herrmann, A.; Van der Mei, H. C.; Norde, W. Pluronic-lysozyme conjugates as anti-adhesive and antibacterial bifunctional polymers for surface coating. *Biomaterials* **2011**, *32*, 6333–6341.
- [12] Pavlukhina, S. V.; Kaplan, J. B.; Xu, L.; Chang, W.; Yu, X.; Madhyastha, S.; Yakandawala, N.; Mentbayeva, A.; Khan, B.; Sukhishvili, S. A. Noneluting enzymatic antibiofilm coatings. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2012**, *4*, 4708–4716.
- [13] Yang, W. J.; Cai, T.; Neoh, K.G.; Kang, E.T.; Dickinson, G. H.; Teo, S. L.-M.; Rittschof, D. Biomimetic anchors for antifouling and antibacterial polymer brushes on stainless steel. *Langmuir* **2011**, *27*, 7065–7076.
- [14] Pop-Georgievski, O.; Popelka, Š.; Houska, M.; Chvostová, D.; Proks, V.; Rypáček, F. Poly(ethylene oxide) layers grafted to dopamine-melanin anchoring layer: stability and resistance to protein adsorption. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3232–3242.
- [15] Hori, K.; Matsumoto, S. Bacterial adhesion: from mechanism to control. *Biochem. Eng. J.* **2010**, *48*, 424–434.
- [16] Katsikogianni, M.; Missirlis, Y. F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur. Cell Mater.* **2004**, *8*, 37–57.
- [17] Beaussart, A.; El-Kirat-Chatel, S.; Herman, P.; Alsteens, D.; Mahillon, J.; Hols, P.; Dufrêne, Y. F. Single-cell force spectroscopy of probiotic bacteria. *Biophys. J.* **2013**, *104*, 1886–1892.
- [18] Harimawan, A.; Rajasekar, A.; Ting, Y.-P. Bacteria attachment to surfaces: AFM force spectroscopy and physicochemical analyses. *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *364*, 213–218.
- [19] Razatos, A.; Ong, Y. L.; Sharma, M. M.; Georgiou, G. Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 11059–11064.
- [20] Busscher, H. J.; Van der Mei, H. C. Microbial adhesion in flow displacement Systems. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 127–141.
- [21] Drescher, K.; Shen, Y.; Bassler, B. L.; Stone, H. A. Biofilm streamers cause catastrophic disruption of flow with consequences for environmental and medical systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 4345–4350.
- [22] Rusconi, R.; Guasto, J. S.; Stocker, R. Bacterial transport suppressed by fluid shear. *Nat. Phys.* **2014**, *10*, 212–217.
- [23] Larson, M. R.; Rajashankar, K. R.; Crowley, P. J.; Kelly, C.; Mitchell, T. J.; Brady, L. J.; Deivanayagam, C. Crystal structure of the c-terminal region of *Streptococcus mutans* antigen

- I/II and characterization of salivary agglutinin adherence domains. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 21657–21666.
- [24] Larson, M. R.; Rajashankar, K. R.; Patel, M. H.; Robinette, R. A.; Crowley, P. J.; Michalek, S.; Brady, L. J.; Deivanayagam, C. Elongated fibrillar structure of a streptococcal adhesin assembled by the high-affinity association of alpha- and PP1I-helices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 5983–5988.

SAMENVATTING

Henk, Henny, since you operate as a team, I won't even try to thank you separately. Thank you for giving me to chance to continue the research I did in my Master as a PhD student. The monthly progress meetings have been extremely valuable and significant in shaping my thesis. Your feedback and ideas about science have been a great source of help. I have great admiration for the dedication both of you have towards science.

Prashant, as my daily supervisor you have helped me to become an independent scientist. The fact that our meetings became scarcer as the end of my PhD was approaching, for me was a sign of more independence. Thank you for all your help at every stage of my PhD, the guidance and advice in the beginning, and the freedom you have given me near the end.

To the reading committee, Prof. dr. **A. Herrmann**, Prof. dr. **P. Buma** and Prof. dr. **L.W. van Rhijn**, thank you for taking the time to read and evaluate my thesis.

Ina, Willy, thank you for all your help with the administrative affairs. **Joop**, thank you for all the help doing XPS, and even more so AFM. Without you I would not have been able finish all my experiments. **Hans**, your skills in Matlab and programming have helped me tremendously when I was doing flow experiments and analyzing biofilms, thank you for this help. **Betsy, Theo, Babs, Roel, Jelmer, Gesinda, Rene, Jelly, Marianne, Roel, Willem**, thank you all for actively or passively helping in all the lab work.

Guru, as my master thesis supervisor, you introduced me to the lab and guided my initial start as a scientist, I am very grateful for the time you took for me during that period and everything you learned me has greatly helped me during my PhD. **Eva**, working with you during my master resulted in my first publication. Thank you for all the scientific help, but also for showing me around Hoboken. **Das**, you introduced me to the world of DNase I; a significant part of my thesis. I am grateful for all your time and help in this area, but even more so for your friendship. **Ed**, this is where I would like to say thank you for helping me write the review that serves as the introduction for my thesis, I could not have finished it in time without you.

Adam, as the experienced PhD student you were when we shared the office, I have learned a lot from you about science, regarding doing experiments, but also about writing papers. Besides the science, even more valuable for me was the trip to Sweden you organized with some of the people from the lab, including me. I was honored to meet your family and stay at your house. Thank you for showing me this part of Sweden and it's traditions.

Brandon, it was great having someone in the office that is so passionate about science. I greatly enjoyed the trip, you, my sister and me made to Orlando, for which you were kind enough to invite us. Exploring the United States guided by an American was an unforgettable experience and besides your kindness, your family was so generous to let us stay at their house. Thank you for this, and also for the honor of asking me as a paronymph for your defense.

ACKNOWLEDGEMENTS

Sara, Rebecca, it has been great to share the office with the two of you. Thank you for making it a pleasure to be at work and even more for all the good times outside of the department.

Deepak, Agnieszka, Ed, Philipp, Stefan, Otto, Katya thank you all for the daily fun in, and even more so, outside of the department. Lunch, coffee breaks, and labwork would not have been as much fun without all of you. Not to mention the drinks, dinners, parties, etc. Thank you all!

Deepak, Ed, thank you for your willingness to be my paranympths and help me organize this important day for me.

To everyone else in the department I have not mentioned, I would like to say thank you for your help, discussions, talks, company and presence; Ferdi, Brian, Anna, Song, Mark, Jesse, Steven, Hilde, Joana, Yun, Helen, Bu, Rene, Niar.

Barbara, your endless love and support means the world to me and I cannot express how grateful I am to you.

Oma, Grada en Gerhard, bedankt voor jullie oneindige interesse in mijn werk en publicaties, ook al waren die laatste meestal moeilijk te begrijpen.

To the most important people in my live, my **parents** and **sister**; your endless and unconditional support has made it possible for me to achieve all of this. Your presence and interest in my work have been my greatest source of motivation. Thank you for always being there for me.

ACKNOWLEDGEMENTS